

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

## PCT

An:

WEICKMANN & WEICKMANN  
Postfach 860 820  
81635 München  
ALLEMAGNE

**Weickmann & Weickmann**  
**E 19. JULI 2004**  
Frist  
Patentanwälte

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

16.07.2004

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
30850P WO

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/09625

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
29.08.2003

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
30.08.2002

Anmelder  
DEGUSSA AG et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Der Anmelder wird auf Artikel 33(5) hingewiesen, in welchem erklärt wird, daß die Kriterien für Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit, die im Artikel 33(2) bis (4) beschrieben werden; nur für die internationale vorläufige Prüfung Bedeutung haben, und daß "jeder Vertragsstaat (...)" für die Entscheidung über die Patentfähigkeit der beanspruchten Erfindung in diesem Staat zusätzliche oder abweichende Merkmale aufstellen" kann (siehe auch Artikel 27(5)). Solche zusätzlichen Merkmale können z.B. Ausnahmen von der Patentierbarkeit, Erfordernisse für die Offenbarung der Erfindung sowie Klarheit und Stützung der Ansprüche betreffen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Rauf, A

Tel. +49 89 2399-7548



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN


## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 19 JUL 2004

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 30850P WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09625	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29.08.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/16		
Anmelder DEGUSSA AG et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Bescheids</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorität</p> <p>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags  05.02.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  16.07.2004	
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Griesinger, I  Tel. +49 89 2399-7596	



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

**Beschreibung, Seiten**

1, 4, 5, 7-15	in der ursprünglich eingereichten Fassung
2, 3, 6	eingegangen am 09.06.2004 mit Schreiben vom 09.06.2004

**Ansprüche, Nr.**

1-11	in der ursprünglich eingereichten Fassung
------	---

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09625

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**siehe Beiblatt**

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 11
	Nein: Ansprüche 1-10
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-11
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ja: Ansprüche: 1-11
	Nein: Ansprüche:

### 2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

**Antrag auf Korrektur von "offensichtlichen Schreibfehlern"**

Keine der beantragten Korrekturen ist gemäß Regel 91 PCT zulässig. Eine Korrektur ist nur dann zulässig, wenn (i) erkennbar ist, daß ein Fehler vorliegt und (ii) eindeutig ist, was beabsichtigt war. Die jeweils vorliegende grössere Lücke zwischen "71 000" und "3 000 Da" und "200 000" und "10 000 Da" und zwischen "des" und "-Typs" und zwischen "40" und "M" können als Hinweis auf einen Fehler gedeutet werden. Es ist jedoch nicht eindeutig, was in die Lücke gehört. Statt den nun geforderten Korrekturen zu "71 000 +/- 3 000 Da" und "200 000 +/- 10 000 Da", "des  $\alpha$ -Typs" und "zwischen 40  $\mu$ M und 100 mM" könnte man sich auch vorstellen, daß jeweils beabsichtigt war, daß zum Beispiel stattdessen "71 000 - 73 000 Da" und "200 000 - 210 000 Da", "des  $\beta$ -Typs" und "zwischen 40 mM und 100 mM" im Text beabsichtigt war. Zusammenfassend gilt, daß bei jeder der beantragten Korrekturen der Fehler offensichtlich war, aber die korrekte Version nicht eindeutig aus dem Zusammenhang hervorgeht. Daher sind die "korrigierten Seiten" 2, 3 und 6 unter Regel 91 PCT nicht zuzulassen. Die Prüfung wird auf der Basis der ursprünglich eingereichten Anmeldeunterlagen durchgeführt.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Zitierte Dokumente und Zusammenfassung der Anmeldung**

Der vorliegende Bescheid nimmt auf folgende, im internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente (D) bezug. Die Nummerierung der Dokumente wird im weiteren Verfahren beibehalten.

D1: Bezakova et al. 2000: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, *Papaver somniferum* L". Chemistry and physics of lipids Bd. 107, Nr. 1, Seite 22.

D2: Pappan und Wang 1999: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D". Biochimica et biophysica acta 1439, Seiten 151-166.

Die vorliegende Anmeldung betrifft eine Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität, die aus zwei Proteinunterfraktionen A und B besteht, wobei beide Unterfraktionen unterschiedliche Eigenschaften z.B. in Bezug auf ihr pH-Optimum haben. Es wird als erstaunlich angesehen, daß diese erfindungsgemäße Proteinfraction nicht nur durch Calcium- sondern auch durch Zinkionen aktivierbar ist. Weitere als unerwartet angegebene Eigenschaften werden auf Seite 5, im ersten Absatz und auf Seite 7 im zweiten und dritten Absatz genannt. Da die Sequenz nicht bestimmt werden konnte (Seite 12, dritter Absatz), wird die Proteinfraction durch Parameter charakterisiert.

D1 ist die Zusammenfassung eines Vortrags der Erfinder. Für die Methoden wird spezifisch auf Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen verwiesen. Das Vorliegen zweier unterschiedlicher Enzyme, deren Molekulargewichte und pH Optima und die Fähigkeit zur Hydrolyse und zur Transphosphatidylierung z.B. von Phosphatidylcholine werden offenbart.

D2 fasst den Stand der Technik für pflanzliche Phospholipase D zusammen. Insbesondere werden die Regulation durch Calciumionen und verschiedene Substrate einschliesslich Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol genannt.

## **2. Neuheit**

Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 ist nicht neu.

2.1 Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf eine Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität, die aus zwei Proteinunterfraktionen A und B besteht, wobei beide Unterfraktionen unterschiedliche Eigenschaften z.B. in Bezug auf ihr pH-Optimum haben. "Unerwartete" Eigenschaften dieser Proteinfraction werden genannt (Seite 5, erster Absatz und Seite 7 zweiter und dritter Absatz).

D1 beschreibt eine Proteinfraction aus demselben Organismus mit denselben Eigenschaften, d.h. auch die "unerwarteten" Effekte der vorliegenden Anmeldung, wie z.B. die Aktivierbarkeit durch Zinkionen. In D1 wird darauf hingewiesen, daß die Proteinfraction aus zwei Unterfraktionen besteht, wobei die Unterfraktionen unterschiedliche hydrolytische Aktivitäten in Abhängigkeit vom pH Wert aufweisen. Die Angaben des Molekulargewichtes in D1 unterscheiden sich von den Angaben in der

vorliegenden Anmeldung (siehe z.B. Anspruch 2) nur im Rahmen der üblichen Messungenauigkeiten. Es ist zu berücksichtigen, daß das Molekulargewicht normalerweise durch Gelelektrophorese unter Verwendung eines Standards bestimmt wird, d.h. die Wandergeschwindigkeiten in einem Gel werden verglichen. Dies führt zu teils beträchtlichen Unterschieden in den angegebenen Werten. Dies spiegelt sich in der Angabe von *Bereichen* für das Molekulargewicht, nämlich in D1 von 110 bis 115 kDa und in der vorliegenden Anmeldung von zwischen 116 und 118 kDa bzw. 112 bis 115 kDa wieder. Außerdem wird auch in der Wortwahl von D1 ("apparent molecular weight") und bei der Wiedergabe des Standes der Technik in der vorliegenden Anmeldung (vgl. Seite 2, Absätze 5 und 6) deutlich, daß derartige Molekulargewichte nicht als exakte Zahlenwerte angesehen werden können. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass die leicht unterschiedlichen Molekulargewichtsbereiche in D1 und in der vorliegenden Anmeldung auf für das Meßverfahren charakteristische Ungenauigkeiten zurückzuführen sind. Weiterhin scheint in D1 aufgrund dieser inherenten Ungenauigkeiten auf eine Differenzierung der nahezu identischen Molekulargewichte der beiden Proteinfractionen verzichtet worden zu sein (vgl. auch Seite 5, Zeilen 1-5 der vorliegenden Anmeldung). Aus dem oben gesagten folgt, daß die Proteine von D1 und der vorliegenden Anmeldung identisch zu sein scheinen. Daher scheint der Gegenstand der Ansprüche 1-8 nicht neu zu sein.

2.2 Die Ansprüche 9 und 10 beziehen sich auf die Verwendung der Proteinfraction zur Hydrolyse und/oder Transphosphatylierung z.B. von Phosphatidylcholin. Da diese enzymatischen Aktivitäten in D1 bereits offenbart sind, muss die Verwendung dieser Aktivitäten als nicht neu angesehen werden.

### **3. Erfinderische Tätigkeit**

Der Gegenstand des Anspruchs 11 ist nicht erfinderisch, da die allgemeine Aktivität der Proteinfraction nämlich Hydrolyse und/oder Transphosphorylierung aus D1 bereits bekannt ist und Phosphatidylinosit als Substrat als willkürliche Auswahl der bekannten Substrate von Phospholipase D Enzymen angesehen werden muss (Zusammenfassung des Standes der Technik z.B. in D3, wobei die Substrate auf Seite 158, rechte Spalte bis Seite 159, erster Absatz der linken Spalte genannt werden).

Auch aus entfettetem Baumwollsaamenmehl ist es gelungen, ein entsprechendes Enzym zu extrahieren.

Neben pflanzlichen Quellen dienen auch Mikroorganismen als Quelle, wobei  
5 insbesondere Corynebakterien (*Corynebacterium ovis*), *Escherichia coli*,  
Bäckerhefezellen und Streptomyceten (*Streptomyces hachijoensis*) zu  
nennen sind.

Phospholipase konnte aber auch aus Säugetierzellen isoliert werden, wie  
10 z. B. aus menschlichen Eosinophilen und Rattenhirnmikrosomen.

Hinsichtlich des Molekulargewichts bietet sich bezüglich der bekannten  
Phospholipasen D ein heterogenes Bild:

15 So weist das aus Baumwollsaamen isolierte lösliche Enzym ein  
Molekulargewicht von  $71\,000 \pm 3\,000$  Da auf; Phospholipase D aus  
Erdnusssamen besitzt ein Molekulargewicht von  $200\,000 \pm 10\,000$  Da und  
PLD aus menschlichen Eosinophilen ein Molekulargewicht von ca.  
60 000 Da.

20

Entsprechende bakterielle Enzyme, wie sie bspw. aus *Corynebacterium ovis*  
isoliert werden können, besitzen ein Molekulargewicht von annähernd  
90 000 Da.

25 Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes sind für Phospholipase D aus  
Erdnusssamen pI-Werte von 4,65 bekannt, wo hingegen der pI eines  
Rohextraktes aus menschlichen Eosinophilen zwischen 4,8 und 5,0 liegt und  
durch zusätzliche Aufreinigung einen Wert zwischen 5,8 und 6,2 annehmen  
kann.

30

Die Aufreinigung von PLD aus Weißkohl in zwei Schritten beschreibt R.  
Lambrecht et al („A facile purification procedure of phospholipase D from



cabbage and its characterization"; (1992) Biol. Chem. Hoppe Seyler Vol 373 (2) 81-88). Diese Methode umfasst eine Ammoniumsulfat-Präzipitation und eine darauffolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Affinitätschromatographie.

- 5 Der Veröffentlichung von I. Schöffner et al („Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage.“; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 79-87 (2002); entsprechend Dissertation (2001)) kann entnommen werden, wie rekombinante Phospholipase D-aktive Isoenzyme aus Weißkohl über Klonierungsverfahren erhalten werden
- 10 können und wie man diese Isoenzyme hinsichtlich ihrer spezifischen Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie hinsichtlich ihrer Transphosphatidylierungseigenschaften charakterisieren kann.
- 15 Einen allgemeinen Überblick zum Kenntnisstand bezüglich Phospholipase D gibt der Übersichts-Beitrag von Michael Heller in Advanced Lipid Research, 1978, Band 16, Seiten 267 bis 326.
- A. Lerchner et al beschreiben in „Identification of two isoenzymes of
- 20 phospholipase D from opium poppy“ (Direct submission (2001) NCBI GenBank, accessions nos. AAL48261 – AAK48264 und Multipler Sequenzvergleich) zwei trunkierte Phospholipase D1 Polypeptide sowie zwei weitere trunkierte Phospholipase D2 Polypeptide aus Papaver somniferum. Wie aus dem multiplen Sequenzvergleich entnommen werden
- 25 kann, haben die Teilaminosäure-Sequenzen der Proteine D1 und D2 eine Sequenzidentität von 98% zueinander. Zudem besitzen die beschriebenen Teilsequenzen eine hohe Homologie (70-84%) zu den gut charakterisierten Phospholipase D-Varietäten des  $\alpha$ -Typs. Da die Sequenz-Ermittlung am 5'-Ende nicht vollständig ist, ist es allerdings nicht möglich, die
- 30 Phospholipase D1- und D2-Polypeptide einem definierten Enzym zuzuordnen.

Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes kann durch weitere Aufreinigung isolierter Fraktionen ein definierter Wert erreicht werden.

5

Die Proteinfraction der vorliegenden Erfindung ist aus diesem Grund auch insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion A einen isoelektrischen Punkt  $pI$  von 8,7 und eine Molekularmasse von 116,4 kDa sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist. Die  
10 entsprechenden bevorzugten Werte der Unterfraktion B betragen hinsichtlich der Molekularmasse 114,1 kDa, hinsichtlich des isoelektrischen Punktes  $pI$  6,7 sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum, das bei pH 5,5 liegt. Auch diese Merkmale werden von der vorliegenden Erfindung umfasst.

15 Wie bereits angegeben, sind Proteinfractionen mit Phospholipase D-Aktivität üblicherweise Calciumionen-abhängig. Diese ausgeprägte Abhängigkeit hat sich allerdings für die beanspruchte pflanzliche Proteinfraction aus Papaveraceen, die zwingend  $Zn^{2+}$ -Ionen aktivierbar ist, nicht bestätigt. Allerdings kann das Aktivitätsoptimum dieser Proteinfraction  
20 auch in Gegenwart von Calcium-Ionenkonzentrationen erreicht werden, die dann üblicherweise zwischen 40  $\mu M$  und 100 mM liegen, wobei entsprechende Enzymaktivitäten bei Konzentrationen zwischen 2 und 20 mM und zwischen 5 und 15 mM auftreten.

25 Bezüglich der Unterfraktion B beansprucht die vorliegende Erfindung eine Protein-Variante, deren Aktivierbarkeitsoptimum in Gegenwart von  $Zn^{2+}$ -Ionenkonzentrationen auftritt, die zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM liegen.

30 Als u.a. erfindungswesentlich sieht die vorliegende Erfindung vor, dass die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, so dass sie also in glykosylierter Form als N-verknüpfte Glykoproteine vorliegen, und



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 30850P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/009625	International filing date (day/month/year) 29 August 2003 (29.08.2003)	Priority date (day/month/year) 30 August 2002 (30.08.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/16		
Applicant DEGUSSA AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 February 2004 (05.02.2004)	Date of completion of this report 16 July 2004 (16.07.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

CT/EP2003/009625

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1, 4, 5, 7-15, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 2, 3, 6, filed with the letter of 09 June 2004 (09.06.2004)
- ☒ the claims:  
pages 1-11, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

**Request for Correction of "Obvious Errors in Documents"**

None of the requested corrections is admissible under PCT Rule 91. A correction is admissible only if (i) it can be determined that there is an error and (ii) it is clear what was intended. Each of the large spaces between "71,000" and "3,000 Da", between "200,000" and "10,000 Da", between "of the" and "type" and between "40" and "M" can be seen to indicate an error. However, it is not clear what belongs within each space. Instead of making the currently requested corrections of "71,000 +/- 3,000 Da" and "200,000 +/- 10,000 Da" as well as "of the  $\alpha$ -type" and "between 40  $\mu$ M and 100 mM", it is also conceivable that the passages were instead intended to read "71,000 to 73,000 Da" and "200,000 to 210,000 Da" as well as "of the  $\beta$ -type" and "between 40 mM and 100 mM". In summary, each of the requested corrections involves an obvious error, yet the correct version does not emerge clearly from the context. For this reason, the "corrected pages" 2, 3 and 6 are inadmissible under PCT Rule 91. The examination is accordingly carried out on the basis of the application as originally filed.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	11	YES
	Claims	1-10	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****1. Cited documents and summary of the application**

Reference is made in the present report to the following search report citations (D). The same numbering of the documents will be used throughout the procedure.

D1: Bezakova et al., 2000: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, *Papaver somniferum* L". Chemistry and physics of lipids, Vol. 107, No. 1, page 22.

D2: Pappan and Wang, 1999: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D". Biochimica et biophysica acta, 1439, pages 151-166.

The present application relates to a protein fraction with phospholipase D activity, said fraction consisting of two protein sub-fractions A and B, the two sub-fractions having different properties, for example, in terms of their pH optimum. It is considered very surprising that the protein fraction according to the invention can be activated not only by calcium but also by zinc ions. Other properties that are considered unexpected are mentioned on page 5, first paragraph, and on page 7, second and third

paragraphs. Since the sequence could not be determined (page 12, third paragraph), the protein fraction is characterized by parameters.

Document D1 is the abstract of a presentation by the inventor. For the methods, specific reference is made to publications of other working groups. The document discloses the presence of two different enzymes, their molecular weights and pH optima and their ability to carry out the hydrolysis and the transphosphatidylation of e.g. phosphatidylcholines.

Document D2 summarizes the prior art for plant phospholipase D. In particular, this document mentions regulation by calcium ions and various substrates, including phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol.

## 2. Novelty

The subject matter of claims 1-10 is not novel.

2.1. Claims 1-8 relate to a protein fraction with phospholipase D activity, said fraction consisting of two protein sub-fractions A and B, the two sub-fractions having different properties, for example, in terms of their pH optimum. "Unexpected" properties of these protein fractions are mentioned (page 5, first paragraph and page 7, second and third paragraphs).

Document D1 describes a protein fraction from the same organism with the same properties, i.e. the same "unexpected" effects as according to the present application, such as e.g. its ability to be activated by zinc ions. Reference is made in D1 to the fact that the

protein fraction consists of two sub-fractions, said sub-fractions having different hydrolytic activities depending on pH value. The statements of molecular weight in D1 differ from the statements made in the present application (see e.g. claim 2) only in terms of the precision of measurements. It should be taken into account that the molecular weight is normally determined by gel electrophoresis using a standard, in other words, the migration rates in a gel are compared. Such a method can result in some considerable differences in the values given. This can be seen in the statement of ranges for the molecular weight, namely from 110 to 115 kDa in document D1 and between 116 and 118 kDa and 112 to 115 kDa in the present application. Furthermore, the wording of D1 ("apparent molecular weight") and the description of the prior art in the present application (cf. page 2, paragraphs 5 and 6) also make it clear that molecular weights such as these cannot be regarded as exact numerical values. Accordingly, it must be assumed that the slightly different molecular weight ranges given in D1 and in the present application are the result of measuring inaccuracies that are characteristic of the measurement method. Moreover, based on these inherent inaccuracies, it does not appear that any attempt was made in D1 to differentiate between the nearly identical molecular weights of the two protein fractions (cf. also page 5, lines 1-5 of the present application). In light of the above, it follows that the proteins according to D1 and those according to the present application appear to be identical. Therefore, the subject matter of claims 1-8 does not appear novel.

2.2. Claims 9 and 10 relate to the use of the protein fractions for the hydrolysis and the transphosphatidylation of e.g. phosphatidylcholines. Since these enzymatic



activities have already been disclosed in document D1, the use of said activities cannot be considered novel.

### 3. Inventive Step

The subject matter of claim 11 is not inventive, since the general activity of the protein fraction, namely hydrolysis and/or transphosphatidylation, is already known from document D1 and the use of phosphatidylinosite as a substrate must be considered a random selection from known substrates of phospholipase D enzymes (summary of the prior art e.g. in D3, where the substrates are mentioned on page 158, right-hand column, to page 159, first paragraph of the left-hand column).